

# 君迁子休眠芽及叶片离体培养体系优化及植株再生

李晶 罗玉洁 张青林 罗正荣 刘继红

华中农业大学园艺林学学院/园艺植物生物学教育部重点实验室, 武汉 430070

**摘要** 以君迁子(*Diospyros lotus* Linn.)休眠芽和叶片为外植体,研究基础培养基种类和外植体基因型对休眠芽初代培养的影响,比较叶片放置方式、TDZ浓度、ZT与TDZ不同浓度组合及暗培养时间对叶片愈伤组织形成和不定芽再生的影响;然后对再生芽进行生根。结果表明:君迁子休眠芽初代培养中,DKW培养基最适合其生长发育,休眠芽生长势最佳;初代培养中,不同基因型的外植体在DKW培养基中生长势基本相同,说明外植体基因型对其初代培养没有影响,但对继代培养影响较大。叶片下表面朝上放置在MS+ZT 0.1 mg/L+TDZ 2.0 mg/L中暗培养20 d,愈伤组织形成率达100%,在(1/2N)MS+2.200 mg/L TDZ上愈伤组织形成率为81.4%;叶片下表面朝上放置在MS+ZT 1.0 mg/L+TDZ 2.0 mg/L中暗培养0 d,不定芽再生率和外植体平均不定芽数最高,分别为34.4%和 $2.1\pm 0.3$ 。组培苗在1/2MS(1/2N)+IBA 1.0 mg/L中培养5 d后,转入1/2MS(1/2N)+1 g/L活性炭培养20 d,生根率为58.14%,平均根数为4条。

**关键词** 君迁子; 叶片; 愈伤组织; 不定芽; 生根; 植株再生

**中图分类号** S 665.3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)04-0014-06

君迁子(*Diospyros lotus* Linn.)是柿科(Ebenaceae)柿属(*Diospyros* Linn.)植物,又名黑枣、牛奶枣、软枣等。目前,山东、河北、河南、山西、陕西分布较多,现在南方也有引种。君迁子喜光,耐寒,耐瘠薄,不耐水湿,浅根系,但根系发达,生长较快,寿命较长。由于其抗逆性强,君迁子在生产上最广泛的用途是做柿树砧木<sup>[1]</sup>。作为柿树的主要砧木,君迁子苗木的需求量也在增加,并且对抗性的要求也在增强。

君迁子与柿是同属植物,亲缘关系很近,而且是柿的主要砧木。然而,君迁子也存在一些问题,如抗旱性较差<sup>[2]</sup>。开展抗性遗传改良是君迁子得以更广泛应用的前提,其关键是有较好的再生体系。进行转基因技术研究的前提是建立高效稳定的遗传转化受体系统。此前对于君迁子组织培养的研究甚少,尚未见关于君迁子最适培养条件的介绍<sup>[3]</sup>。但有一些学者进行过甜柿组织培养的研究,马俊莲等<sup>[4]</sup>发现甜柿上西早生叶片适合在低矿物质元素,尤其是较低氮素含量的培养基中增殖与生长。目前,国内还未见关于君迁子遗传转化的研究报告,在一定程

度上限制了使用基因工程技术对君迁子进行抗逆性改良的研究。基于此,本研究参考甜柿组培条件,以君迁子休眠芽为外植体,比较组培过程中的各种因素(如基础培养基、外植体基因型等),拟筛选出最适君迁子生长发育与再生的培养条件,建立君迁子组织培养体系,为后续遗传转化研究提供试验材料,以期对君迁子基因转化和砧木性状改良奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料来源

在华中农业大学柿基因库基因型为L<sub>2</sub>和L<sub>3</sub>的君迁子成年树上采集无病虫害、生长健壮、冬芽饱满的休眠芽。

### 1.2 休眠芽初代培养基的筛选

配制3种培养基:(1/2N)MS和1/2MS+蔗糖30 g/L+琼脂7.5 g/L+PVP 0.6 g/L+ZT 0.5 mg/L+IAA 0.01 mg/L(pH 5.8),DKW+蔗糖30 g/L+琼脂6.0 g/L+PVP 0.5 g/L+ZT 0.5 mg/L+IAA 0.01 mg/L(pH 5.8)。取君迁子L<sub>2</sub>和L<sub>3</sub>成年树上当年生无病虫害、生长健壮、冬芽饱满

收稿日期: 2015-07-23

基金项目: 农业部公益性行业科研专项(201203047)

李晶, 硕士研究生, 研究方向: 果树逆境生理与分子生物学. E-mail: 63538931@qq.com

通信作者: 刘继红, 博士, 教授, 研究方向: 果树逆境生理与分子生物学. E-mail: liujihong@mail.hzau.edu.cn

的枝条,用自来水冲洗3~4遍,剪下顶芽、腋芽为外植体;双蒸水洗3遍,浸入75%乙醇30 s后转入2% NaClO 10 min,无菌水清洗5~6遍(带有振荡);剥去芽外鳞片,留茎尖约1.5 mm(保留2~3片叶原基),接种到培养基上,每种培养基上接种25个休眠芽,20 d后观察结果,重复2次;培养室温度 $25 \pm 2$  °C,光照时间16 h/d,光强1 500~2 000 lx的培养条件下进行无菌培养。

### 1.3 叶片培养

继代4次的君迁子 $L_3$ 组培苗,在无菌条件下,留顶端3~4片叶,取下面所有叶片,均横切为4 mm×4 mm左右。分别接种于(1/2N)MS+蔗糖20 g/L+琼脂7.5 g/L+PVP 0.6 g/L+TDZ(0.022、0.220、2.200 mg/L)(pH 5.8)。每种质量浓度接种约48片叶,分2组,分别为上表面和下表面接触培养基。暗培养20 d,分析叶片愈伤组织形成比例。

同样大小的叶片切片培养在MS+蔗糖30 g/L+琼脂7.5 g/L+PVP 0.5 g/L(pH 5.8)的培养基上,培养基中添加的激素质量浓度按正交设计 $L_9(3^3)$ 设置(表1)。每处理接种32片,重复2次。培养条件同本文“1.2”(除暗处理时间外)。30 d后更换同样质量浓度激素的培养基。40 d后进行数据统计,确定影响因素及处理水平。

表1  $L_9(3^3)$ 正交设计分析激素组合的作用

Table 1 Analysis of the hormonal effects using  $L_9(3^3)$  orthogonal designing

组合 Combinations	ZT/ (mg/L)	TDZ/ (mg/L)	暗培养时间/d Time of culture in dark
1	0.1	0.1	0
2	0.1	1.0	10
3	0.1	2.0	20
4	1.0	0.1	10
5	1.0	1.0	20
6	1.0	2.0	0
7	2.0	0.1	20
8	2.0	1.0	0
9	2.0	2.0	10

### 1.4 生根培养

以再生芽为试材,在含蔗糖30 g/L+琼脂7.5 g/L+PVP 0.5 g/L+ZT 0.5 mg/L+IAA 0.01 mg/L(pH 5.8)的(1/2N)MS培养基中继代培养,选取48株培养了30 d长于2 cm的君迁子有效新梢试验。采用两步生根法,首先在含蔗糖30 g/L+琼脂7.5 g/L+PVP 0.5 g/L+IBA 1.0 mg/L的

1/2MS(1/2N)培养基中光照培养5 d,然后转入含蔗糖30 g/L+琼脂7.5 g/L+PVP 0.5 g/L+活性炭1.0 g/L的1/2MS(1/2N)培养基中光照培养20 d后进行数据统计。

### 1.5 数据分析

愈伤组织形成率=形成愈伤组织的叶片数/接种叶片数×100%;白色愈伤组织形成率=形成白色愈伤组织的叶片数/接种叶片数×100%。不定芽再生率=产生再生芽的叶片数/接种叶片数×100%,叶片平均不定芽数=再生芽总数/产生再生芽的叶片数。采用SPSS统计分析软件进行方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 基础培养基种类对初代培养的影响

由图1可见,君迁子 $L_2$ 和 $L_3$ 休眠芽在DKW、(1/2N)MS、1/2MS 3种培养基中初代培养20 d时,DKW培养基的培养效果最好,(1/2N)MS次之,1/2MS培养基中生长情况最差。休眠芽在DKW培养基中长势好,生长快,叶展开幅度大,但叶片偏黄。在(1/2N)MS培养基中叶抱紧,叶片较绿。用1/2MS培养的休眠芽生长较慢,芽体变大,但未展叶(图1A、B)。

### 2.2 不同基因型对初代培养的影响

在同一种培养基中,君迁子 $L_2$ 和 $L_3$ 休眠芽初代培养20 d时生长状况相似,无明显快慢区别(图1C、D)。说明君迁子基因型不同,对其初代组织培养没有影响。 $L_2$ 和 $L_3$ 组培苗在(1/2N)MS培养基中继代培养3次时, $L_3$ 生长情况优于 $L_2$ (图1E、F),说明基因型对继代培养影响很大。

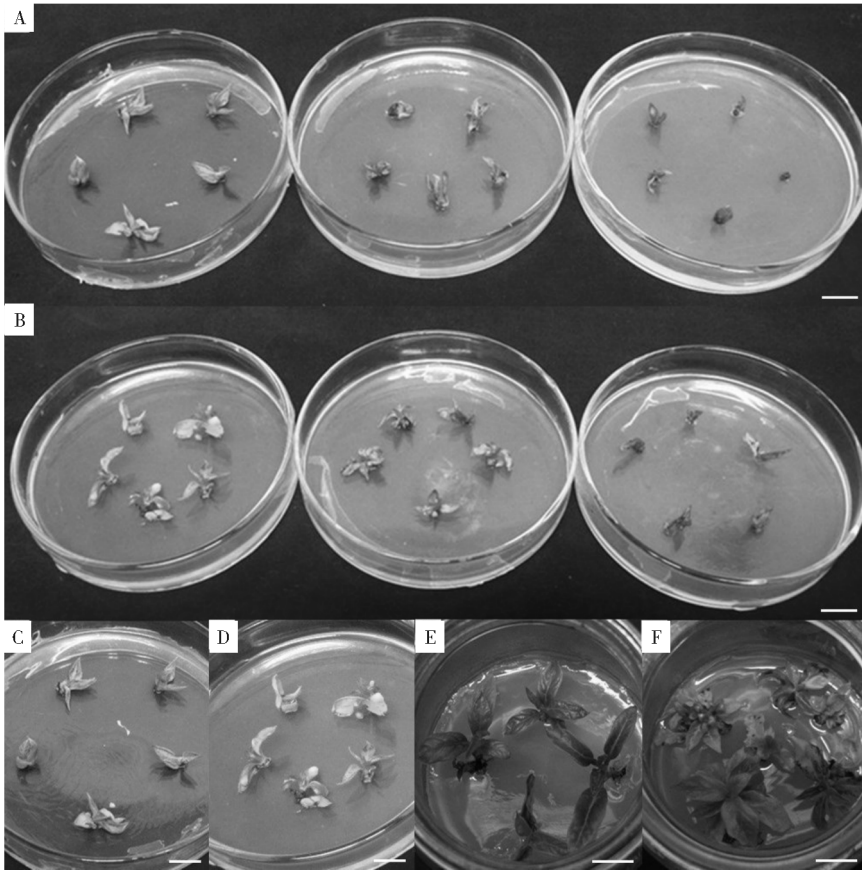
### 2.3 叶片放置方式对愈伤组织形成的影响

由表2可见,在(1/2N)MS培养基中将叶片下表面朝上接种后,愈伤组织形成率91.7%,明显高于将其上表面朝上接种的70.8%。说明叶片下表面朝上培养效果明显优于上表面朝上放置。

表2 叶片放置方式对愈伤组织形成的影响

Table 2 Effects of leaf placement on callus formation of *D. lotus* L.

放置方式 Placemant	愈伤组织形成率/% Callus formation percentage
上表面朝上 Adaxial surface upwards	70.8
下表面朝上 Abaxial surface upwards	91.7



A-B: 君迁子  $L_2$  和  $L_3$  的休眠芽分别在 DKW、(1/2N)MS、1/2MS 培养基中初代培养 20 d, 休眠芽生长势对比; C-D: 君迁子  $L_2$  和  $L_3$  休眠芽在 (1/2N)MS 培养基中初代培养 20 d, 休眠芽生长势对比; E-F: 君迁子  $L_2$  与  $L_3$  组培苗继代培养 3 次时, 生长势对比; 标尺 = 0.5 cm。A-B: The comparison of date plum  $L_2$  and  $L_3$  dormant bud grew 20 d in DKW, (1/2N)MS, 1/2MS mediums; C-D: The comparison of date plum  $L_2$  and  $L_3$  dormant bud grew 20 d in (1/2N)MS medium; E-F: The comparison of date plum  $L_2$  and  $L_3$  subcultured for three times on (1/2N)MS medium. Bars = 0.5 cm.

图 1 君迁子  $L_2$  和  $L_3$  休眠芽培养

Fig.1 *In vitro* culture of dormant buds of *D. lotus* L.  $L_2$  and  $L_3$

## 2.4 不同质量浓度 TDZ 对愈伤组织形成的影响

由表 3 可见, TDZ 对诱导愈伤组织形成效果良好, 但是绝大部分都褐化了。TDZ 质量浓度为

2.200 mg/L 时, 诱导愈伤形成率最高 (81.4%), 同时白色愈伤形成率也最高 (38.1%)。0.022 mg/L TDZ 处理时, 部分叶片已褐化死亡, 其他 2 种质量

表 3 不同质量浓度的 TDZ 对愈伤组织形成的影响

Table 3 Effects of TDZ concentrations on callus formation of *D. lotus* L.

组合 Combinations	TDZ/(mg/L)	愈伤组织形成率/% Callus formation percentage	白色愈伤组织形成率/% White callus formation percentage
1	0.022	66.7	8.3
2	0.220	81.3	25.0
3	2.200	81.4	38.1

浓度处理较少出现这一现象。

## 2.5 ZT 和 TDZ 组合和暗培养时间对不定芽再生的影响

由表 4 可见, 愈伤组织形成率都很高, 但是大部分愈伤都是褐色至黑色, 最适合君迁子愈伤组织形成的植物生长调节剂组合为 ZT 0.1 mg/L + TDZ

2.0 mg/L, 暗培养 20 d, 愈伤组织形成率达 100%, 且形成的愈伤组织均为白色 (图 2A)。暗培养时间的延长有助于愈伤组织的形成, 据观察, 暗培养 20 d 的叶片愈伤组织体积明显大于其他组合。最先长出不定芽的组合是第 6 组 ZT 1.0 mg/L + TDZ 2.0 mg/L 暗培养, 在第 20 天时就已长出 2 个不定芽 (图

2B、C),说明光照对不定芽再生有促进作用。由表4还可以看出,在第40天时,形成不定芽数最多,不定芽再生率和平均不定芽数分别达到34.38%和 $2.1 \pm 0.3$ 。TDZ质量浓度很低时不定芽再生率很低,甚至完全不能再生,随着TDZ质量浓度的增加,愈伤

组织形成率和不定芽再生率有明显增高,说明TDZ在诱导君迁子不定芽再生中起主要作用,辅助使用1.0 mg/L ZT即可。若要获取愈伤组织则采取长时间暗培养,若要获取不定芽,直接光下培养即可。

表4 不同质量浓度的ZT和TDZ组合结合暗处理对不定芽再生的影响

Table 4 Effects of ZT and TDZ concentrations and darkness on shoot regeneration of *D. lotus* L.

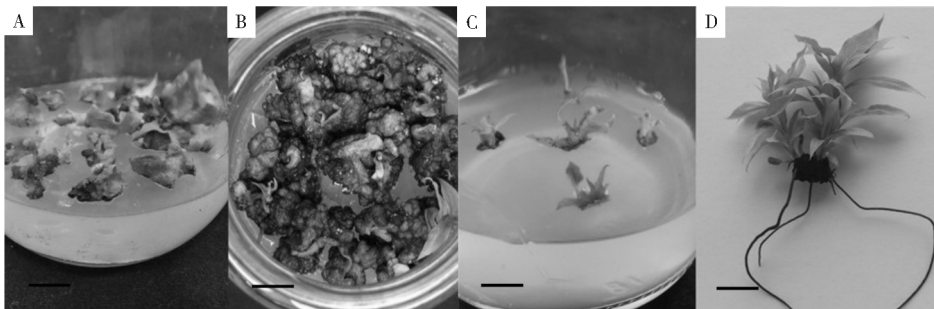
组合 Combination	ZT/ (mg/L)	TDZ/ (mg/L)	暗培养时间/d Time of culture in dark	愈伤组织形成率/% Callus formation percentage	不定芽再生率/% Shoot regeneration percentage	平均不定芽数 No.of shoots per explant
1	0.1	0.1	0	90.6ab	0.0b	
2	0.1	1.0	10	96.9a	23.4ab	$1.6 \pm 0.1ab$
3	0.1	2.0	20	100.0a	17.2ab	$1.8 \pm 0.4ab$
4	1.0	0.1	10	95.3a	0.0b	
5	1.0	1.0	20	90.6ab	12.5ab	$1.3 \pm 1.8ab$
6	1.0	2.0	0	96.9a	34.4a	$2.1 \pm 0.3a$
7	2.0	0.1	20	81.3b	4.7b	$0.5 \pm 0.7ab$
8	2.0	1.0	0	96.9a	7.8b	$2.1 \pm 0.2a$
9	2.0	2.0	10	95.3a	14.1ab	$1.8 \pm 1.1ab$

注:同列内相同字母表示用邓肯氏新复极差法在0.05水平上检测差异不显著。Note:With the same letters in a column show that they are not significantly different,as analyzed by Duncan's multiple range test at  $P=0.05$ .

## 2.6 不同处理对君迁子组培苗生根的影响

生根处理25 d后进行数据统计,发现58.14%

的不定芽生根成功,长出3~5条约3 cm长的黑色新根(图2D),平均根数为4条。



A:叶片切口形成愈伤组织(培养20 d); B:愈伤组织上形成不定芽(培养40 d); C:切下不定芽; D:组培苗生根。标尺=0.5 cm。  
A:Callus was induced from segments of leaf(cultured for 20 d); B:Adventitious buds were induced from callus(cultured for 40 d);  
C:Cut the adventitious buds from the callus; D:Rooting plant.Bars=0.5 cm.

图2 君迁子叶片培养再生植株

Fig.2 Plant regeneration from leaf segments of *D. lotus* L.

## 3 讨论

### 3.1 培养基的选择

MS培养基在木本植物组织培养中使用得最为广泛,还有WPM、CM、SH、改良的Nitsch等基本培养基,大多数使用改良过的MS培养基<sup>[5]</sup>。刘晓娜等<sup>[6]</sup>通过试验证实上西早生柿继代培养时在DKW培养基中丛生苗的生成量较多,组培苗的生长状态好于(1/2N)MS培养基,是因为DKW培养基中N、P、K含量均高于(1/2N)MS;而MS培养基中的N

含量高于DKW,所以在MS培养基中的组培苗最高。Kochanová等<sup>[7]</sup>得出的结果也相似。刘恺<sup>[8]</sup>发现富有柿和次郎柿在DKW培养基中增殖倍数和有效新梢率均高于MS和WPM培养基。有研究表明培养阶段因培养目的不同,合适的培养基也不同<sup>[9]</sup>。本研究中君迁子初代培养时,DKW培养基效果最好,休眠芽展叶快,且生长较健壮;但是后续继代培养中,使用DKW培养基的组培苗茎段较长,叶茂盛但呈黄绿色,叶畸形不平展;使用(1/2N)MS培养基继代的组培苗生长矮壮,茎与叶的比例适中,分生出



很多腋芽,苗底部常形成 2~3 个腋芽,腋芽增殖系数高,叶片绿色较不平展;1/2MS 培养效果则不佳,休眠芽生长缓慢。本研究认为君迁子与大部分甜柿相同,适合在低氮培养基中生长,但其他培养基成分不可减少;DKW 培养基适合君迁子茎段的生长,(1/2N)MS 培养基适合君迁子腋芽的增殖。

### 3.2 基因型差异

不同基因型的柿树植物再生能力存在较大的差异<sup>[10-12]</sup>。在本试验中,虽然初代培养君迁子 L<sub>2</sub> 和 L<sub>3</sub> 在生长势上没有很大的区别,但在后续继代中,L<sub>3</sub> 生长和繁殖能力明显高于 L<sub>2</sub>;培养条件相同的君迁子 L<sub>2</sub> 和 L<sub>3</sub>,前者生长紧凑,茎干较少,腋芽不发育,底部叶片将组培苗包裹,生长缓慢;后者则生长势强,形成了许多腋芽,并且腋芽生长发育快,增殖系数高。组培过程中还发现,L<sub>2</sub> 休眠芽中内生菌较多,在培养基表面形成粉色菌落。

### 3.3 叶片放置方式的影响

本研究观察到,近轴面朝上放置的叶片卷起,每片叶仅 2~3 个支撑点与培养基接触;而远轴面朝上放置的叶片虽四周切口卷起,但叶面大部分仍与培养基接触。笔者认为由于气孔多存在于叶片下表面,置于上面能更好地进行呼吸作用,对愈伤组织的形成有促进作用;并且君迁子叶片培养一段时间后,其卷曲方向为向下表面方向,下表面朝上放置与培养基接触的面积更大,有利于其吸收营养。刘月英等<sup>[13]</sup>以磨盘柿为材料,对于接种方式的结论与本研究截然相反。

### 3.4 植物生长调节剂的作用

TDZ 是脲类细胞分裂素,并且是其中活性最强的一种。已经有报道 TDZ 在木本植物的不定芽生长中非常有效<sup>[14]</sup>。在本研究中,TDZ 处理能有效促进君迁子不定芽再生,所以推荐使用,但由于其售价较高,应配合适量 ZT 使用。而且富有柿的不定芽在添加 TDZ 的培养基上生长不佳,但是转入添加 ZT 的培养基后就恢复生长并长出茎段<sup>[15]</sup>。ZT 是从玉米嫩籽中分离出的,是一种存在于高等植物中的天然细胞分裂素,与 TDZ 配合使用,在组织培养中有很好的促进愈伤组织生芽的作用<sup>[16]</sup>。在几乎所有的细胞分裂素中,玉米素在促进植物生长方面比激素更有效。

### 3.5 再生芽生根

20 世纪 90 年代研究柿组织培养的多为国外学者,他们的研究均表明柿存在生根难的问题。Fukui

等<sup>[17]</sup>对多种甜柿进行了生根试验,发现大多数都存在生根困难的现象。Tetsumura 等<sup>[18]</sup>对富有、花御进行生根培养时,发现这 2 个甜柿品种在培养初期生根很困难;但继代多次之后再生根,生根率有明显提升,即便如此,在培养 74 代以后生根率也只能达到 63%。但是,后来很多国内学者在多种柿生根试验上都得到了较高的生根率。刘聪娟等<sup>[19]</sup>对上西早生、富有和次郎组培苗进行了生根试验,在 1/2MS+IBA 1.0 mg/L+IAA 1.0mg/L 上培养 40 d,生根率达到 90%以上。马俊莲等<sup>[20]</sup>认为 IBA 的生根效果好于 IAA,在 1/2MS+IBA 1.0 mg/L 的培养基上,次郎和富有的生根率近 75%,平均不定根数达 3 条以上。本研究中君迁子的生根率比较高,延长培养时间,生根率会达到更高。君迁子适宜在低氮的培养基中生根,并且激素处理时间不宜过长。

## 参 考 文 献

- [1] 宗亦臣,何燕,郑勇奇,等.君迁子天然群体表型变异研究[J].湖南林业科技,2013,40(4):1-6.
- [2] 史胜青,孙晓光,王颖,等,水分胁迫对 4 树种幼苗叶水势和持水力的影响[J].河北农业大学学报,2009,32(6):24-28.
- [3] 谢启鑫,庄东红.油柿叶片离体再生体系的建立[J].农业生物技术科学,2008,24(8):136-139.
- [4] 马俊莲,刘晓娜,张子德.甜柿上西早生叶片不定芽再生的研究[J].中国农业科学,2004,37(12):2016-2018.
- [5] 李青林,邹永田,刘广林,等.木本观赏植物组织培养技术[J].河北农业科学,2010,14(6):38-41.
- [6] 刘晓娜.上西早生柿组织培养及植株再生的研究[D].保定:河北农业大学,2004.
- [7] KOCHANOVÁ Z, ONUS N, BRINDZA J. Adventitious shoot regeneration from dormant buds of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) cv. Hachiya [J]. J Agrobiol, 2011, 28: 113-118.
- [8] 刘恺.富有柿与次郎柿组织培养技术的研究[D].保定:河北农业大学,2005.
- [9] 马燕,韩瑞超,臧德奎,等.木本观赏植物组织培养研究进展[J].安徽农业科学,2012,40(4):1956-1958.
- [10] 刘恺,贾春风.甜柿品种“富有”组织培养技术研究[J].保定师范专科学校学报,2007,20(2):51-53.
- [11] 王尚堃,全瑞霞,翟宝黔,等.博爱八月黄柿组织培养影响因素研究[J].湖南农业大学学报,2010,36(2):176-180.
- [12] 郑广顺,赵晓玉,张徐俞,等.颐和园古柿树组织培养快繁体系的建立[J].西北农业学报,2012,21(10):89-94.
- [13] 刘月英,马俊莲,唐霞,等.柿叶片不定芽再生的研究[J].湖北农业科学,2006,45(5):618-621.
- [14] DOBRANSZKI J, DA SILVA J A T. *In vitro* shoot regenera-

- tion from transverse thin cell layers of apple leaves in response to various factors [J]. *J Hort Sci Biotech*, 2013, 88(1): 60-66.
- [15] TOMOSABURO Y, YUJI M, YASUTAKE S. Adventitious bud formation through nodule induction by thidiazuron in cultured leaf segments of the Japanese persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) [J]. *Plant Biotechnol*, 2011, 28: 339-344.
- [16] 邓艳. 激素及LED光质对蓝莓和文心兰离体快繁的影响[D]. 南昌: 江西农业大学, 2011.
- [17] FUKUI H, NISHIMOTO K, NAKAMURA M. Varietal differences in rooting ability of *in vitro* subcultured Japanese persimmon shoots [J]. *J Jpn Soc Hort Sci*, 1992, 60: 821-825.
- [18] TETSUMURA T. Effect of types of cytokinin used for *in vitro* shoot proliferation of Japanese persimmon on the subsequent rooting of shoots [J]. *Acta Hort*, 1997, 436: 143-148.
- [19] 刘聪娟, 唐霞, 刘恺, 等. 甜柿组培苗生根条件的研究[J]. 河北林果研究, 2006, 21(2): 185-188.
- [20] 马俊莲, 刘恺, 张子德. ‘富有’和‘次郎’甜柿叶片再生植株的研究[J]. 园艺学报, 2006, 33(5): 1048-1050.

## ***In vitro* culture system optimization and regeneration of date plum (*Diospyros lotus* Linn.) dormant buds and leaves**

LI Jing LUO Yujie ZHANG Qinglin LUO Zhengrong LIU Jihong

*College of Horticulture and Forestry Sciences, Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*

**Abstract** The effects of basal medium and explants on the primary culture of dormant buds of date plum (*Diospyros lotus* Linn.) were studied. The effects of inoculation methods, TDZ concentrations, combinations of plant growth regulators and induction period under dark condition on callus formation, adventitious bud regeneration and root regeneration were investigated. The results showed that DKW was the best basal medium for the primary culture of dormant buds, as revealed by better growth of the buds. Genotypes had no impacts on primary culture, but influenced subculture obviously. Inoculation of the segments with the adaxial surfaces contacting medium on MS+ZT 0.1 mg/L+TDZ 2.0 mg/L under darkness for 20 d led to 100% formation of callus, but the percentage was only 81.4% on (1/2N)MS+2.200 mg/L TDZ. Inoculation of leaf segments, adaxial surfaces contacting medium, on MS medium containing ZT 1.0 mg/L+TDZ 2.0 mg/L, dark treatment for 0 d, resulted in the 34.4% of shoot regeneration, while average shoots numbers per explant were  $2.1 \pm 0.3$ . Inoculated the plantlets on 1/2MS (1/2N)+IBA 1.0 mg/L for 5 d, then transplanted them on 1/2MS(1/2N)+1 g/L activated carbon for 20 d. Rooting of date plum reached 58.14% and the average number of adventitious roots was 4.

**Keywords** date plum (*Diospyros lotus* Linn.); leaf segment; callus; adventitious bud; rooting; plant regeneration

(责任编辑: 张志钰)